

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-093711

(43)Date of publication of application : 16.04.1993

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

B01D 57/02

(21)Application number : 03-139986

(71)Applicant : HITACHI LTD

(22)Date of filing : 12.06.1991

(72)Inventor : KANBARA HIDEKI
NAGAI KEIICHI

(30)Priority

Priority number : 02337074

Priority date : 30.11.1990

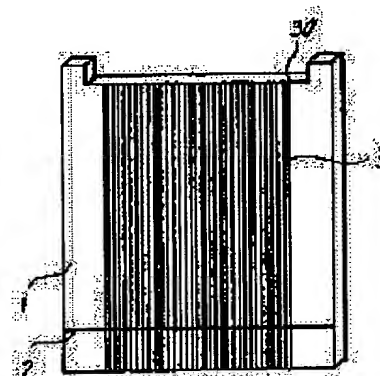
Priority country : JP

(54) NARROW-GROOVE TYPE ELECTROPHORESIS DEVICE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a narrow-groove type electrophoresis device having high sensitivity and throughput.

CONSTITUTION: Numerous capillary electrophoresis paths are formed of numerous narrow grooves 3 by putting a glass plate 1 with a laser irradiation groove 2 and the numerous narrow grooves 3 upon a plate having no groove. Since the cross section of the electrophoresis path of this narrow-groove type electrophoresis device can be reduced, the volume of a DNA band can be reduced and a small amount of sample can be measured. In addition, the throughput of the electrophoresis device can be improved.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

14.10.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

2910319

[Date of registration]

09.04.1999

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-93711

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

G 0 1 N 27/447

B 0 1 D 57/02

7726-4D

7235-2J

7235-2J

7235-2J

G 0 1 N 27/ 26

3 2 5 A

3 1 5 A

G 0 1 N 27/ 26

3 1 5 B

審査請求 未請求 請求項の数8(全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-139986

(22)出願日 平成3年(1991)6月12日

(31)優先権主張番号 特願平2-337074

(32)優先日 平2(1990)11月30日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72)発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72)発明者 永井 啓一

東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74)代理人 弁理士 小川 勝男

(54)【発明の名称】 細溝型電気泳動装置

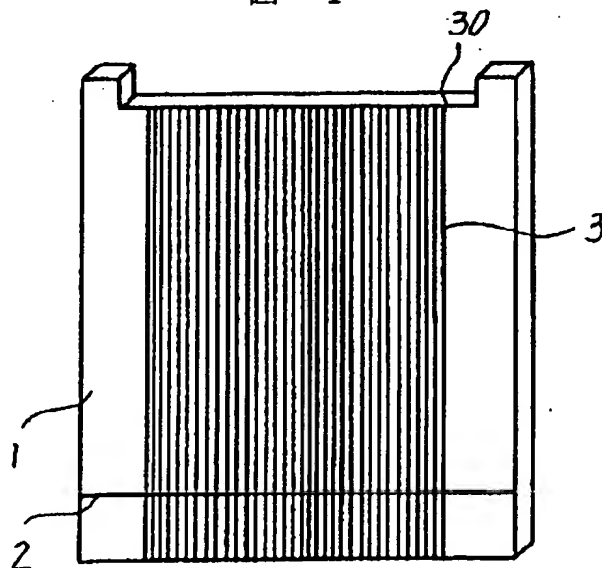
(57)【要約】

【目的】高感度でスループットの大きい細溝型電気泳動装置を提供する。

【構成】レーザ照射溝2と多数の細溝3を有する細溝付ガラス板1と、溝のない平板とを密着して重ね合わせることにより、多数のキャピラリー泳動路を細溝3によって形成する。

【効果】泳動路断面積を小さくすることができるので、DNAバンドの体積を小さくでき、微量サンプルの測定が可能となるとともにスループットが向上する。

図 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料断片が泳動する泳動路の途中の検出位置にレーザー光を照射し、該レーザー光の照射により生じる蛍光標識物質の発光の実時間推移を検出して前記試料断片が前記検出位置を通過したとの情報を得る実時間検出の電気泳動装置において、表面に微細な溝が設けられた第1の平板と、該第1の平板に密着する第2の平板と有し、該第1、第2の平板で形成される微細な管を泳動路とすることを特徴とする細溝型電気泳動装置。

【請求項2】 前記泳動路にはゲルが充填されていることを特徴とする請求項1に記載の細溝型電気泳動装置。

【請求項3】 前記第1の平板には、泳動路となる複数の溝と、該複数の溝と直角方向に前記レーザー光を通すための溝とが設けられることを特徴とする請求項1に記載の細溝型電気泳動装置。

【請求項4】 前記第2の平板には、上記溝の位置に対応させて試料注入口と断片流出口が設けられることを特徴とする請求項1に記載の細溝型電気泳動装置。

【請求項5】 前記第1、第2の平板の少なくとも一方はガラス材で形成される請求項1に記載の細溝型電気泳動装置。

【請求項6】 前記第1、第2の平板の少なくとも一方は表面を絶縁物でコーティングした金属板であることを特徴とする請求項1に記載の細溝型電気泳動装置。

【請求項7】 前記第1の平板の溝が平板を削ることにより形成されることを特徴とする請求項1に記載の細溝型電気泳動装置。

【請求項8】 前記第1の平板の溝は線状あるはリボン状の突起物を平板に固着させることにより形成するか、又は2枚の平板間にリボンあるいはワイヤー状物を挟み込んで泳動路を形成することを特徴とする請求項1に記載の細溝型電気泳動装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は蛍光標識したDNA等の生物試料を電気泳動により分離検出する装置、たとえばDNAシーケンサーもしくは遺伝子診断装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 従来、DNAの塩基配列決定は放射性元素でDNAを標識し、ゲル電気泳動分離した後に分離パターンフィルムに転写することにより行なっていた。しかし、放射性標識を用いる煩雑さに加えて手間と時間のかかる難点があり、蛍光標識を用いた実時間光検出を用いた方法が用いられ始めている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 このような蛍光標識と平板型ゲル（スラブゲル）による方法は高感度が得られない難点があり、測定体積を小さくし感度を上げる工夫がキャピラリー電気泳動を用いてなされている。しか

し、キャピラリー電気泳動を用いる方法では泳動路を1本しか確保できないため、スルーブットが小さい上、DNAシーケンシングでは末端塩基種A、C、G、およびTの識別に発光波長の異なる蛍光体を使用する必要がある、励起効率の良い光源と蛍光体の組み合わせをすべてについて実現することは困難である。

【0004】 本発明の目的はこの問題点を解決し、高感度でスルーブットの大きなDNA等の分離検出装置を提供するものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 上記目的は石英あるいはガラス平板に多数の溝を作成し、この溝内にゲルを形成して、キャピラリー型泳動路を構成することにより達成される。

【0006】

【作用】 石英板に堀られた多数の直線（あるいは曲線）状溝の1つ1つがキャピラリー泳動路と同じ役割を果たす。1cm当り少なくとも10本以上の溝を堀ることができるので横巾10cmの領域に100本以上の泳動路を確保できる。溝の径を小さくすることにより、DNAバンドの体積を小さくできる。検出限界は背景光と目的物からの蛍光の大小で決定される。このため小さな体積の中に試料を押し込めることにより微量検出が実現できる。

【0007】

【実施例】 以下、本発明の一実施例を図1～図4により説明する。図1に示すゲル保持板となるガラス板1の片面には巾0.2mm、深さ0.2mmの溝3が1mm間隔できざまれ細溝付ガラス板が形成される。間隔は0.5mmあるいはそれ以下にすることもできる。上端から2.5cmの所に泳動路と直角にレーザー照射用の溝2（巾0.4mm 深さ0.3mm）が設けられている、上端は試料注入部であり、各溝3の端30はすりばち状に広げられている。その端面の断面は約0.5φで、試料注入を容易に行なえるようにしてある。図2に示すようにこの細溝付ガラス板1を溝のないガラスの平板4とを密着して重ね合わせてキャピラリー泳動路を形成する。これらの泳動路にポリアクリルアミドゲルを形成し図2に示したようにセットする。ガラス板3と4の積層体からなる泳動板は垂直に立てられ、その上部にはゲルが形成された各泳動路の上端にバッファ溶液が接するよう、上部バッファ槽13が設けられる。また泳動路の下端は、下部バッファ槽12のバッファ溶液に接するように設置される。DNA等の試料をゲル上端にそれぞれ添加し、バッファ槽13と12の間に泳動用電圧を印加して泳動分離を行なう。実施例では、TexaoRed（励起極大波長596nm、発光極大波長615nm）で標識したDNAを上部から泳動させ分離した。励起光源5にはPMS（Particle Measurement Systems）社製He-Neレーザー（発振波長594nm、出力2.5mW）を用いた。レーザー光はミラー6に反射させ、溝2を通るように泳動板の側面から入射さ

せ、もってすべての泳動路を均一に照射する。蛍光標識DNA断片がレーザー照射部を通過する時蛍光を発するが、線状照射部つまり溝2からの蛍光像は波長選別用フィルター8を通過した後、レンズ9によりイメージ増幅器11の受光面に結像され、例えばダイオードアレーからなる高感度ラインセンサー、あるいは例えばCCDのような二次元光検出器10で検出される。図3は測定中の一時期の蛍光像の強度分布を示したもので、蛍光標識DNA断片の通過中の泳動路部分から蛍光が見られる。図4は試料としてλファージを制限酵素Hind IIIで切断し、切断部に蛍光標識を入れたDNA断片を泳動させた例である。特定の泳動路から出る蛍光の時間変化を示したものでDNA断片スペクトルに相当する。DNAバンドの巾は約0.7mmで1つのバンド当り 2×10^{-10} mole という微量のDNAを含んでいるに過ぎないがS/N良くピークが検出されている。

【0008】上述の実施例では泳動板を垂直にして用いたが、図5に示したような泳動板を用い水平位置で動作させる事も可能である。この泳動板では、溝3がきざまれた細溝付ガラス板1と密着させるもう1枚のガラス板4'には図5(a)に示すように試料注入口とする穴16を各溝3に対応させて設け、容易に試料注入を行なう事ができる利点がある。

【0009】さらに、各溝3の他方の端に近い位置に対応する位置には、各溝に共通に泳動断片流出のための長方形の穴15が設けられる。細溝付ガラス板1とガラス板4'が密着され、これにより生じるキャピラリー、及び上記の穴15、16にゲルが形成されて複数のキャピラリー泳動路となる。なお、溝3は試料注入口16に対応する位置から断片流出口15に対応する位置に渡って設けられていれば良いが、図1に示すようにガラス板1の一端から他端に渡って設けられていても良い。いずれにしても、泳動路は試料注入口から断片流出口までとなり、試料注入口16がガラス板の端面でなくガラス板4'の主面に並んでいるので、試料注入が容易となる。このような泳動板は図5(b)に示すように水平に設置され、試料注入口16の位置、及び断片流出口15の位置にはバッファ槽13'及び12'がそれぞれ設置される。試料注入口16にそれぞれ分析する試料液が注入された後、各バッファ槽をバッファ溶液で満たし、電圧印加により電気泳動を行なうと溝2にレーザー光を照射して断片の通過を検出する。これらの実施例においてDNAを多色蛍光標識し、発する蛍光をプリズム等を用いて波長選別受光することにより、スループットの向上あるいはDNAシーケンシングにおけるA、C、G、T、DNA末端を発光波長の差により識別する機能を具備させることもできる。

【0010】また以上の実施例では、泳動媒質としてポリアクリルアミドゲルを用いたが、この他にアガロース等のゲルおよび導電性の液体などを用いてもよいことは

明白である。

【0011】以上の実施例ではゲル保持板(平板)に溝を作ったが、細溝付平板は図6に示す実施例のように平板に線状あるいはリボン状の突起物を固着したり、又は平板間にガラス線、高分子線あるいはリボン17(材質はポリエチレンテレフタレート、アクリルなど)あるいは他の絶縁性素材あるいは高電気抵抗素材からなるワイヤーあるいはリボンを挟み込み保持し、多数の泳動路3を形成することもできる。リボンやワイヤーは各泳動路を分離する役目を果す。図6の実施例では細溝付平板と平板を密着して重ね合わせキャピラリー泳動路を形成するが、線状あるいはリボン状の突起物を2枚の平板の双方にそれぞれ交互に固着したのち、密着して重ね合わせても同様にキャピラリー泳動路を形成することができる。

【0012】溝がきざまれる平板3、及びこれと密着させる平板4もしくは4'としては、石英ガラス、耐熱強化ガラス等のガラス材が適切であるが、ある程度の熱伝導性を有する絶縁物であれば使用することができる。エッチング可能な感光性ガラスを使用すれば正確に多数の溝をエッチングにより再現性良く形成することができる。一方、導電性を有する板材料であっても、板あるいは板に溝をきざんだ後に表面を絶縁物質でコーティングして用いることも可能である。例えば、表面を酸化被膜、もしくは窒化被膜で絶縁層とした金属板をいずれかの平板に使用すれば、電気泳動で生じる熱を排出するのに有利となる。

【0013】DNAなどの検出には図1に示した側面入射方式の他、励起光スキャンの方式を用いてもよい。

【0014】

【発明の効果】本発明によれば、泳動路の断面積を溝により小さく制限することができ、DNAバンドの体積を小さくできるので微量の試料で計測することができる。たとえば、従来の平板型ゲルを用いたDNA計測ではゲルの厚さ0.3~0.5mm、DNAバンドの巾2~5mmが用いられていた。すなわち泳動路の断面積は小さい方でも0.6mm²内外であった。一方、本発明では実施例で0.04mm²、更に溝の巾を小さくすることで0.01mm²あるいはそれ以下の泳動路断面積を得ることも可能である。面積を小さくした事で1~2桁の微量サンプルでの測定が可能となった。また作製する溝も1mmに1~2本は作れるので従来10cmに20~30本しか確保できなかった泳動路数を100本以上にすることができ、スループットの向上に大きな効果がある。また、泳動路間隔が1mmあるいはそれ以下なので温度差が小さく、泳動路によりDNAの泳動速度に差がでないのでDNAを1種の蛍光体で標識し泳動路の差で末端DNA塩基種を識別するシーケンシングにも有効に活用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】溝付ガラス板の平面図。

10

20

30

40

50

5

6

【図2】測定装置の概念図。

【図3】測定された信号の一例。

【図4】特定位置における蛍光強度変化を測定したDNA断片スペクトル。

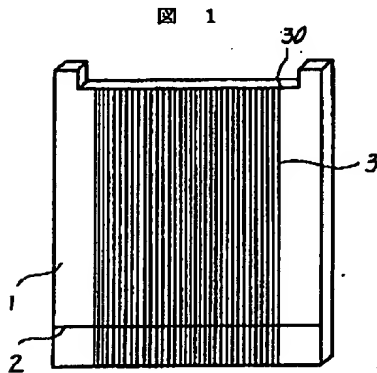
【図5】水平型泳動槽の例。

【図6】泳動路分離リボン付泳動板の見取り図。

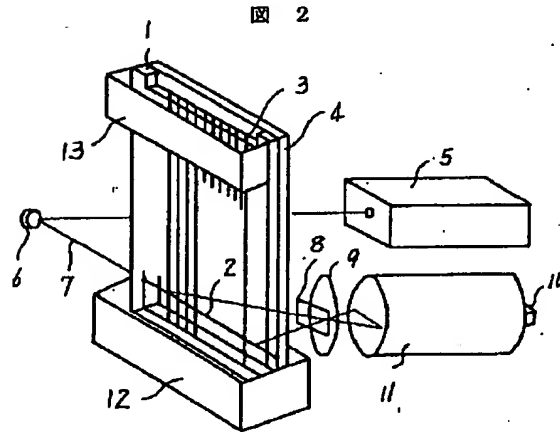
【符号の説明】

* 1…細溝付ガラス板、2…レーザ照射溝、3…泳動用細溝、4…平板、5…レーザー、6…ミラー、7…レーザー光、8…フィルター、9…レンズ、10…1次元あるいは2次元光検出器、11…イメージ増幅器、12…下部バッファ槽、13…上部バッファ槽、14…DNA断片ピーク、15…DNA断片流出口、16…DNA断片注入口、17…泳動分離リボン。

【図1】

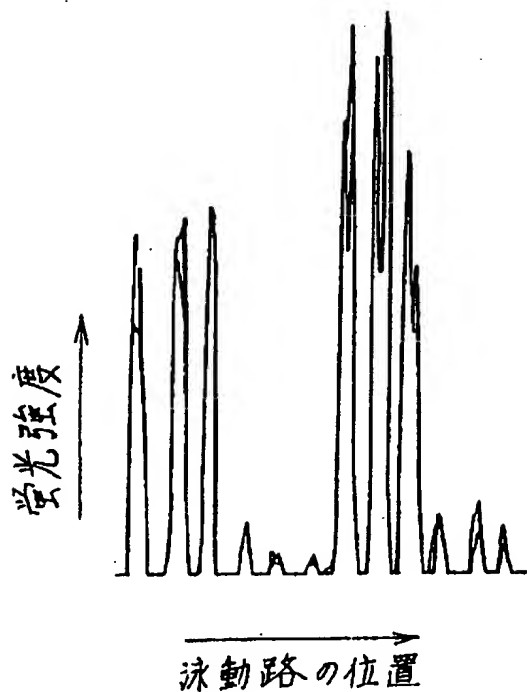


【図2】



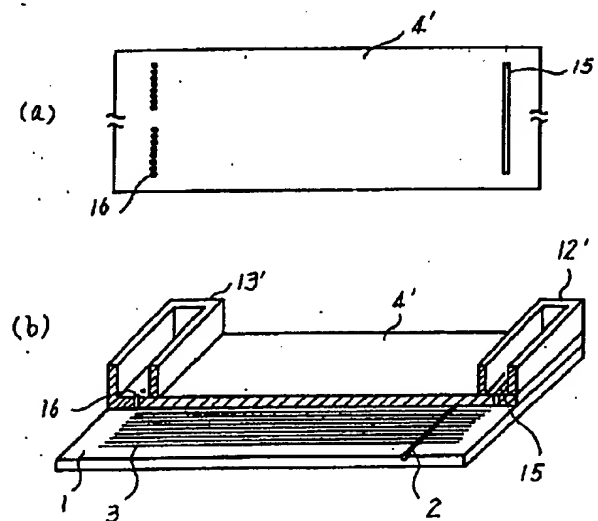
【図3】

図 3



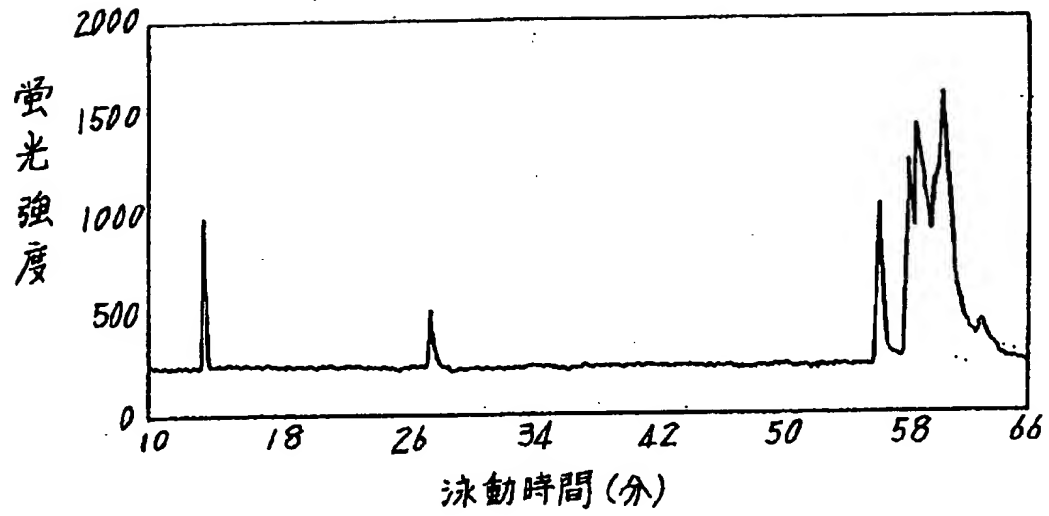
【図5】

図 5



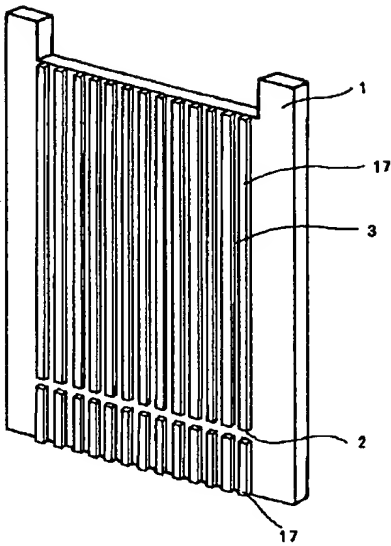
【図4】

図 4



【図6】

図 6



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号
7235-2 J

F I

技術表示箇所

3 3 1 Z